



#1

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

ATTY.'S DOCKET: MUKAI=1

In re Application of: ) Art Unit:  
Hiroyuki MUKAI et al. ) Examiner:  
Appln. No.: 09/935,338 ) Washington, D.C.  
Filed: August 23, 2001 ) Confirmation No.  
For: METHOD FOR AMPLIFYING ) October 23, 2001  
NUCLEIC ACID SEQUENCE )

REQUEST FOR PRIORITY

Honorable Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

In accordance with the provisions of 37 CFR §1.55 and the requirements of 35 U.S.C. §119, filed herewith are certified copies of the following Japanese applications:

Appln. No.: 11/076966	Filed: March 19, 1999
Appln. No.: 11/370035	Filed: December 27, 1999
Appln. No.: 2000/251981	Filed: August 23, 1999
Appln. No.: 2000/284419	Filed: September 19, 2000
Appln. No.: 2000/288750	Filed: September 22, 2000
Appln. No.: 2001/104191	Filed: April 3, 2001

It is respectfully requested that applicant be granted the benefit of the priority dates of the foreign applications.

Respectfully submitted,

BROWDY AND NEIMARK, P.L.L.C.  
Attorneys for Applicant(s)

By

Allen C. Yun  
Registration No. 37,971

ACY:pr  
Telephone No.: (202) 628-5197  
Facsimile No.: (202) 737-3528  
F:\A\Aoyb\Mukai\PTO\PriorityDocPTOCoverLtr.doc



日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

1999年 3月19日

出願番号

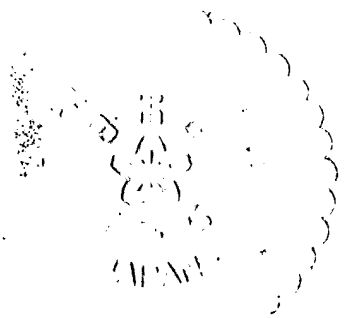
Application Number:

平成11年特許願第076966号

出願人

Applicant(s):

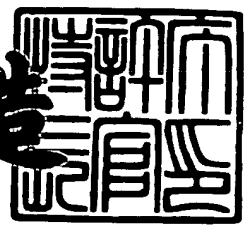
寶酒造株式会社



2001年 9月10日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3083105

【書類名】 特許願

【整理番号】 T-1371

【提出日】 平成11年 3月19日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68  
C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 向井 博之

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 山本 純子

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 萩屋 道雄

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 浅田 起代蔵

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造株式会社 中  
央研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代表者】 大宮 久

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 063223

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸配列の増幅方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸配列を少なくとも 1 種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる核酸配列に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(b) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(c) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より、鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行う；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法。

【請求項 2】 2 種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸配列の鎖を 2 種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーのうちの 1 つにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる核酸配列に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(b) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(c) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より、鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (b) の工程に再度利用され、；

(d) 上記工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として (a) で使用されたキメ

ラオリゴヌクレオチドプライマーと異なるキメラオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、置換鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、置換鎖の一本鎖に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断ために配置され；

(e) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(f) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より置換鎖の一本鎖に相補的核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む2本鎖核酸が(e)の工程に再度利用される；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法。

【請求項3】 等温で行うことを特徴とする請求項1または2記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項4】 鋳型となる核酸配列がDNA配列である請求項1～3いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項5】 さらに、工程(a)の前にRNAを鋳型として、逆転写酵素による逆転写反応により1本鎖のcDNAを調製する工程を含み、該1本鎖のcDNAを鋳型となる核酸配列とすることを特徴とする請求項1～4いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項6】 逆転写酵素が、トリ骨髄芽球症ウイルス由来のAMV RTase、モロニーネズミ白血病ウイルス由来のMMLV RTase、モロニーネズミ白血病ウイルス由来逆転写酵素であってRNaseH活性の欠失した変異体であるSuperscript II<sup>TM</sup>及びラウス関連ウイルス2由来のRAV-2 RTaseからなる群から選択される逆転写酵素であることを特徴とする請求項5記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項7】 逆転写酵素が、耐熱性を有するDNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項1～5いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項8】 逆転写酵素が、サーマス サーモフィラス由来のDNAポリメラーゼであるTth DNAポリメラーゼ、バチルス ステアロサーモフィラ

ス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損B s t DNAポリメラーゼ、もしくは、パチルス カルドテナックス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損B c a DNAポリメラーゼからなる群より選択されるDNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項7記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項9】 核酸配列を増幅するための方法であって、鋳型となる2本鎖DNAを2種類の相補的な1本鎖DNAに変性する前処理をした後に、

(a) 上記のいずれか一方の1本鎖DNAを鋳型となる核酸配列として少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる核酸配列の一本鎖に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(b) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(c) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行う；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法。

【請求項10】 2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー（イ及びロとする）を使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、鋳型となる2本鎖DNAを2種類の相補的な1本鎖DNA（A鎖及びB鎖）に変性する前処理をした後に

(a) 上記のA鎖1本鎖DNAを鋳型となる核酸配列として少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー（イ）により処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となるA鎖の核酸配列に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(b) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼ

(c) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より A 鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (b) の工程に再度利用され、；

(d) 上記工程で得られる遊離した置換鎖 C 鎖を鋳型として (a) で使用されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーと異なるキメラオリゴヌクレオチドプライマー (ロ) により処理して、C 鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、C 鎖の一本鎖に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(e) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；

(f) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より C 鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (e) の工程に再度利用され、；

(g) 上記の鋳型となるもう一方の 1 本鎖 DNA の B 鎖については、B 鎖 1 本鎖 DNA を鋳型となる核酸配列として (a) で使用されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーと異なるキメラオリゴヌクレオチドプライマー (ロ) により処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる B 鎖の核酸配列に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(h) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；

(i) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より B 鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (h) の工程に再度利用され、；

(j) 上記工程で得られる遊離した置換鎖 D 鎖を鋳型として (g) で使用されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーと異なるキメラオリゴヌクレオチドプライマー (イ) により処理して、D 鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、



ここで前記プライマーは、D鎖の一本鎖に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(k) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(1) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点よりD鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む2本鎖核酸が(k)の工程に再度利用される；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法。

【請求項 1 1】 プライマーからの伸長が、鎖置換能を有するDNAポリメラーゼにより行われることを特徴とする請求項 1 ～ 1 0 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 1 2】 DNAポリメラーゼが、大腸菌由来のDNAポリメラーゼ I のクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損B s t DNAポリメラーゼ、及びバチルス カルドテナックス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損B c aポリメラーゼからなる群から選択されるDNAポリメラーゼである請求項 1 1 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 1 3】 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となるRNAを逆転写用プライマーにより処理して、逆転写酵素による逆転写反応を行い一本鎖のcDNAを調製し、さらに該cDNAを鋳型となる核酸配列として少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸配列に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(b) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(c) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より鋳型に相

補的な核酸配列の鎖置換を行う；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法。

【請求項 14】 2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となるRNAを2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー（イ及びロとする）のうちの一方のキメラヌクレオチドプライマー（イ）より処理して、逆転写酵素による逆転写反応を行い一本鎖のcDNAを調製し、さらに該cDNAを鋳型となる核酸配列として、もう一方のキメラオリゴヌクレオチドプライマー（ロ）により処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記（ロ）プライマーは、鋳型となる核酸配列に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(b) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；

(c) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む2本鎖核酸が（b）の工程に再度利用され、；

(d) 上記工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として（a）で使用されたキメラオリゴヌクレオチドプライマー（ロ）と異なるキメラオリゴヌクレオチドプライマー（イ）により処理して、置換鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、置換鎖の一本鎖に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(e) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(f) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より置換鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む2本鎖核酸が（e）の工程に再度利用される；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法。

【請求項 15】 さらにもう 1 種類の逆転写反应用プライマーを使用することを特徴とする請求項 13 又は請求項 14 記載の核酸配列の合成方法。

【請求項 16】 逆転写反应用プライマーがオリゴ d T プライマー、ランダムプライマーもしくは、特異的プライマーからなる群より選択されるプライマーであることを特徴とする請求項 15 記載の核酸の増幅方法。

【請求項 17】 プライマーからの伸長が、鎖置換能を有する DNA ポリメラーゼにより行われることを特徴とする請求項 13～16 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 18】 DNA ポリメラーゼが逆転写活性を有することを特徴とする請求項 13～17 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 19】 DNA ポリメラーゼが、バチルス ステアロサーモフィラス由来の 5'→3' エキソヌクレアーゼ欠損 B s t DNA ポリメラーゼ、及びバチルス カルドテナックス由来の 5'→3' エキソヌクレアーゼ欠損 B c a DNA ポリメラーゼからなる群より選択される DNA ポリメラーゼであることを特徴とする請求項 18 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 20】 逆転写反応に、トリ骨髄芽球症ウイルス由来の AMV R T a s e、モロニーネズミ白血病ウイルス由来の MMLV R T a s e、モロニーネズミ白血病ウイルス由来逆転写酵素であって R N a s e H 活性の欠失した変異体である Superscript II<sup>TM</sup> 及びラウス関連ウイルス 2 由来の R A V-2 R T a s e からなる群より選択される逆転写酵素を用いることを特徴とする請求項 13～17 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 21】 DNA ポリメラーゼが、大腸菌由来の DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の 5'→3' エキソヌクレアーゼ欠損 B s t DNA ポリメラーゼ、及びバチルス カルドテナックス由来の 5'→3' エキソヌクレアーゼ欠損 B c a ポリメラーゼからなる群より選択される DNA ポリメラーゼであることを特徴とする請求項 20 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 22】 等温で行うことを特徴とする請求項 9～21 いずれかに記

載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 23】 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) デオキシヌクレオチド 3 リン酸、鎖置換能を有する DNA ポリメラーゼ、少なくとも 1 種類の鋳型となる核酸配列の一本鎖に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマー、及び当該プライマーの伸長物を切断するエンドヌクレアーゼを鋳型となる核酸配列と混合し；そして

(b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物を反応させる、ことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

【請求項 24】 2 種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有してなる請求項 23 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 25】 鋳型となる核酸配列が、一本鎖 DNA、2 本鎖 DNA 由来のそれぞれの 1 本鎖、または RNA から逆転写反応によって得られた cDNA からなる群より選択される核酸配列であることを特徴とする請求項 23 又は 24 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 26】 プライマーからの伸長が、鎖置換能を有する DNA ポリメラーゼにより行われることを特徴とする請求項 25 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 27】 DNA ポリメラーゼが、大腸菌由来の DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 B s t DNA ポリメラーゼ、及びバチルス カルドテナックス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 B c a ポリメラーゼからなる群より選択される DNA ポリメラーゼであることを特徴とする請求項 26 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 28】 エンドヌクレアーゼがエンドリボヌクレアーゼである請求項 1 ～ 27 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 29】 エンドリボヌクレアーゼが RNase H である請求項 28 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 30】 エンドヌクレアーゼが耐熱性である請求項 1 ～ 29 記載い

いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 31】 デオキシヌクレオチドの 3' 末端側にリボヌクレオチドが結合した構造を有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いることを特徴とする請求項 1～30 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 32】 少なくとも 1 残基のリボヌクレオチドを含有し、その 3' 末端より DNA 鎖の伸長が可能なキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、リボヌクレアーゼの作用により上記リボヌクレオチド残基の 3' 末端側が切断されるよう設計されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用する請求項 31 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 33】 キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、RNase H の作用によりリボヌクレオチド残基の 3' 末端側で切断されるよう設計された請求項 32 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 34】 キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、連続した 2 残基以上のリボヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項 33 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 35】 リボヌクレオチドが未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチドを含有する配列である請求項 31～34 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 36】 キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、修飾ヌクレオチドとしてリボヌクレオチド 3 リン酸の  $\alpha$  位のリン原子に結合している酸素原子を硫黄原子に置き換えた ( $\alpha$ -S) リボヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項 35 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 37】 請求項 1～30 のいずれかに記載の方法に用いる DNA 増幅用のプライマーであって、デオキシヌクレオチドとリボヌクレオチドを含有することを特徴とするキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 38】 デオキシヌクレオチドの 3' 末端側にリボヌクレオチドが結合した構造を有する請求項 37 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 39】 少なくとも 1 残基のリボヌクレオチドを含有し、その 3' 末端より DNA 鎖の伸長が可能なキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、

、リボヌクレアーゼの作用により上記リボヌクレオチド残基の 3' 末端側が切断されるよう設計された請求項 38 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 40】 RNase H の作用によりリボヌクレオチド残基の 3' 末端側で切断されるよう設計された請求項 39 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 41】 連続した 2 残基以上のリボヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項 40 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 42】 リボヌクレオチドが未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項 37～41 いずれかに記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 43】 キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、修飾ヌクレオチドとしてリボヌクレオチド 3 リン酸の  $\alpha$  位のリン原子に結合している酸素原子を硫黄原子に置き換えた ( $\alpha$ -S) リボヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項 42 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 44】 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸配列を少なくとも 1 種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる核酸配列に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、RNase H の切断のために連続した 2 残基以上のリボヌクレオチドがプライマーの 3' 末端側に配置され；

(b) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖を RNase H で切断し；そして

(c) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より、鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行う；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法。

【請求項 45】 2 種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸配列の鎖を 2 種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー

のうちの 1 つにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる核酸配列に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、RNase H の切断のために連続した 2 残基以上のリボヌクレオチドがプライマーの 3' 末端側に配置され；

(b) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(c) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より、鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (b) の工程に再度利用され、；

(d) 上記工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として (a) で使用されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーと異なるキメラオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、置換鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、置換鎖の一本鎖に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、RNase H の切断のために連続した 2 残基以上のリボヌクレオチドがプライマーの 3' 末端側に配置され；

(e) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(f) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より置換鎖の一本鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (e) の工程に再度利用される；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法。

【請求項 4 6】 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) デオキシヌクレオチド 3 リン酸、鎖置換能を有する DNA ポリメラーゼ、少なくとも 1 種類の鋳型となる核酸配列の一本鎖に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、RNase H の切断のために連続した 2 残基以上のリボヌクレオチドがプライマーの 3' 末端側に配置されたキメラオリゴヌクレ

オチドプライマー、及び当該プライマーの伸長物を切断する RNase H を鋳型となる核酸配列と混合し；そして

(b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物を反応させる、ことを特徴とすると核酸配列の増幅方法。

【請求項 4 7】 2 種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有してなる請求項 4 6 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 4 8】 鋳型となる核酸配列が、一本鎖 DNA、2 本鎖 DNA 由来のそれぞれの 1 本鎖 DNA、または RNA から逆転写反応によって得られた cDNA からなる群より選択される核酸配列であることを特徴とする請求項 4 4 ~ 4 7 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 4 9】 プライマーからの伸長が、鎖置換能を有する DNA ポリメラーゼにより行われることを特徴とする請求項 4 8 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 5 0】 DNA ポリメラーゼが、大腸菌由来の DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 Bst DNA ポリメラーゼ、及びバチルス カルドテナックス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 Bca ポリメラーゼからなる群より選択される DNA ポリメラーゼであることを特徴とする請求項 4 9 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 5 1】 等温で行うことを特徴とする請求項 2 3 ~ 5 0 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 5 2】 耐熱性の RNase H を用いることを特徴とする請求項 3 1 ~ 5 1 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 5 3】 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸配列を少なくとも 1 種類のオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる核酸配列に実質的に相補的で、エンドヌクレアーゼの切断のためにリボヌクレオチドが配置され；

(b) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして



(c) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より、鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行う；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法。

【請求項 5 4】 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸配列の鎖を 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーのうちの 1 つにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる核酸配列に実質的に相補的で、エンドヌクレアーゼの切断のためにリボヌクレオチドが配置され；

(b) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(c) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より、鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (b) の工程に再度利用され、；

(d) 上記工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として (a) で使用されたオリゴヌクレオチドプライマーと異なるオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、置換鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、置換鎖の一本鎖に実質的に相補的で、エンドヌクレアーゼの切断のためにリボヌクレオチドが配置され；

(e) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(f) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より置換鎖の一本鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (e) の工程に再度利用される；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法。

【請求項 5 5】 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) デオキシヌクレオチド 3 リン酸、鎖置換能を有する DNA ポリメラーゼ、少なくとも 1 種類の鋳型となる核酸配列の一本鎖に実質的に相補的で、RNase H により切断されるための連続した 2 残基以上のリボヌクレオチドがプライマ

一の 3' 末端側に配置されたオリゴヌクレオチドプライマー、及び当該プライマーの伸長物を切断する RNase H を鋳型となる核酸配列と混合し；そして

(b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物を反応させる、ことを特徴とすると核酸配列の増幅方法。

【請求項 5 6】 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーを含有してなる請求項 5 5 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 5 7】 未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチドで構成されたオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする請求項 5 3 ～ 5 6 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 5 8】 鋳型となる核酸配列が、一本鎖 DNA、2 本鎖 DNA 由来のそれぞれの 1 本鎖 DNA、または RNA から逆転写反応によって得られた cDNA からなる群より選択される核酸配列であることを特徴とする請求項 5 3 ～ 5 7 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 5 9】 プライマーからの伸長が、鎖置換能を有する DNA ポリメラーゼにより行われることを特徴とする請求項 5 8 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 6 0】 DNA ポリメラーゼが、大腸菌由来の DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 Bst DNA ポリメラーゼ、及びバチルス カルドテナックス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 Bca ポリメラーゼからなる群より選択される DNA ポリメラーゼであることを特徴とする請求項 5 9 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 6 1】 等温で行うことを特徴とする請求項 5 3 ～ 6 0 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 6 2】 耐熱性の RNase H を用いることを特徴とする請求項 5 3 ～ 6 1 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子工学分野において有用な DNA の合成方法に関し、鋳型とな

る核酸配列の増幅方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子工学分野の研究においてDNAの合成は種々の目的に使用される。このうちオリゴヌクレオチドのような短鎖のDNAの合成を除けば、そのほとんどはDNAポリメラーゼを利用した酵素的な方法により実施されている。例えば、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法（PCR法）があるが、それは米国特許第4,683,195号、第4,683,202号および第4,800,159号に詳細に記述されている。もう一つの例としては、トレンズ イン バイオテクノロジー（Trends in Biotechnology 10、p146-p152、1992）に記載の当該方法と逆転写酵素反応を組合わせた逆転写PCR法（RT-PCR法）が挙げられる。上記の方法の開発により、DNAから、若しくはRNAから目的とする領域を増幅することが可能になった。

【0003】

これらのDNA合成方法は、目的とするDNA領域を増幅させるために例えば、二本鎖鋳型DNAの一本鎖への解離（変性）、一本鎖鋳型DNAへのプライマーのアニーリング、プライマーからの相補鎖合成（伸長）の3つのステップからなる反応により、もしくは、“シャトルPCR”（『PCR法最前線』、「蛋白質 核酸 酵素」別冊、第41巻、第5号、425頁～428頁（1996））と呼ばれる、前述の3ステップ反応のうちプライマーのアニーリング及び伸長のステップを同一温度で行なう2ステップ反応により実施される。

【0004】

さらに別法としては、1989年6月14日に公開された欧州特許出願第320,308号に記述されているリガーゼ・チェーン・リアクション（LCR）法が挙げられる。上記3法は、次の増幅サイクルのための一本鎖標的分子を再生するために、高温から低温の反応を何回も繰り返す必要がある。このように温度によって反応が制約されるため、反応系は不連続な相またはサイクルで行なう必要がある。

【0005】

従って、上記の方法には広い温度範囲で、かつ、厳密な温度調整を経時的に行なうことのできる高価なサーマルサイクラーを使用することが必要となる。また、該反応は、2種類～3種類の温度条件で行なうため設定温度にするために要する時間が必要であり、そのロス時間はサイクル数に比例して増大していく。

【0006】

そこで、上記問題点を解決すべく等温状態で実施可能な核酸増幅法が開発された。例えば、特公平7-114718号に記載の鎖置換型増幅(SDA; strand displacement amplification)法、自立複製(3SR; self-sustained sequence replication)法、日本国特許番号第2650159号に記載の核酸配列増幅(NASBA; nucleic acid sequence based amplification)法、日本国特許番号第2710159号に記載のQベータレプリカーゼ法等が挙げられる。これらの等温核酸増幅法の反応においては、プライマーの伸長や、一本鎖伸長生成物(又は元の標的配列)へのプライマーのアニールリングや、それに続くプライマーの伸長は、一定温度で保温された反応混合物中で同時に起こる。

【0007】

これらの等温核酸増幅法のうち最終的にDNAが増幅される系、例えば、SDA法は、DNAポリメラーゼと制限エンドヌクレアーゼが介する二本鎖の置換による、試料中の標的核酸配列(およびその相補鎖)の増幅法であるが、該方法では、増幅に使用するプライマーは4種類必要であり、その内の2種類は、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含むように構築する必要がある。また、該方法では、DNA合成のための基質として、修飾されたデオキシヌクレオチド3リン酸、例えば3リン酸の中 $\alpha$ 位のリン酸基の酸素原子が硫黄原子(S)に置換されたデオキシヌクレオチド3リン酸を大量に用いる必要があり、ルーチンワークで反応を行なう遺伝子検査等においては、そのランニングコストが深刻な問題となってくる。さらに該方法では、増幅されたDNA断片中に修飾ヌクレオチド、たとえば $\alpha$ S置換デオキシヌクレオチドが含まれるため、例えば、増幅後のDNA断片を制限酵素長多型(RFLP; restriction enzyme fragment length polymorphism)解析に供しようとする場合に、該断片が制限酵素で切断できないことがある。

【0008】

上記のように従来の等温核酸増幅法は、まだまだ種々の問題をかかえており、低ランニングコストで、かつ結果的に得られたDNA断片をさらに遺伝子工学的な処理に使用することが可能な核酸配列の増幅方法が求められていた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、オリゴヌクレオチドプライマーの存在下にDNA合成反応を行なうことを特徴とする簡便で、効率の良い核酸配列の増幅方法を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

即ち、本発明の要旨は、

[1] 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸配列を少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる核酸配列に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され

；

(b) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(c) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より、鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行う；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法、

[2] 2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸配列の鎖を2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーのうちの1つにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる核酸配列に実質的に相補的で

、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断ために配置され；

(b) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(c) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より、鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (b) の工程に再度利用され、；

(d) 上記工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として (a) で使用されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーと異なるキメラオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、置換鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、置換鎖の一本鎖に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断ために配置され；

(e) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(f) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より置換鎖の一本鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (e) の工程に再度利用される；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法、

[3] 等温で行うことを特徴とする請求項 1 または 2 記載の核酸配列の増幅方法、

[4] 鋳型となる核酸配列が DNA 配列である請求項 1 ～ 3 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[5] さらに、工程 (a) の前に RNA を鋳型として、逆転写酵素による逆転写反応により 1 本鎖の cDNA を調製する工程を含み、該 1 本鎖の cDNA を鋳型となる核酸配列とすることを特徴とする請求項 1 ～ 4 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[6] 逆転写酵素が、トリ骨髄芽球症ウイルス由来の AMV R T a s e, モロ

ニーネズミ白血病ウイルス由来のMMLV RTase、モロニーネズミ白血病ウイルス由来逆転写酵素であってRNase H活性の欠失した変異体であるSuperscript II<sup>TM</sup>及びラウス関連ウイルス2由来のRAV-2 RTaseからなる群から選択される逆転写酵素であることを特徴とする請求項5記載の核酸配列の増幅方法、

[7] 逆転写酵素が、耐熱性を有するDNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項1～5いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[8] 逆転写酵素が、サーマス サーモフィラス由来のDNAポリメラーゼであるTth DNAポリメラーゼ、パチルス ステアロサーモフィラス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bst DNAポリメラーゼ、もしくは、パチルス カルドテナックス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼからなる群より選択されるDNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項7記載の核酸配列の増幅方法、

[9] 核酸配列を増幅するための方法であって、鋳型となる2本鎖DNAを2種類の相補的な1本鎖DNAに変性する前処理をした後に、

(a) 上記のいずれか一方の1本鎖DNAを鋳型となる核酸配列として少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる核酸配列の一本鎖に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(b) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(c) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行う；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法、

[10] 2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー（イ及びロとする）を使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、鋳型となる2本鎖DNAを2種類の相補的な1本鎖DNA（A鎖及びB鎖）に変性する前処理をした後に

(a) 上記の A 鎖 1 本鎖 DNA を鋳型となる核酸配列として少なくとも 1 種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー (イ) により処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる A 鎖の核酸配列に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(b) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；

(c) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より A 鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (b) の工程に再度利用され、；

(d) 上記工程で得られる遊離した置換鎖 C 鎖を鋳型として (a) で使用されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーと異なるキメラオリゴヌクレオチドプライマー (ロ) により処理して、C 鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、C 鎖の一本鎖に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(e) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；

(f) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より C 鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (e) の工程に再度利用され、；

(g) 上記の鋳型となるもう一方の 1 本鎖 DNA の B 鎖については、B 鎖 1 本鎖 DNA を鋳型となる核酸配列として (a) で使用されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーと異なるキメラオリゴヌクレオチドプライマー (ロ) により処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる B 鎖の核酸配列に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；



(h) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；

(i) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より B 鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (h) の工程に再度利用され、；

(j) 上記工程で得られる遊離した置換鎖 D 鎖を鋳型として (g) で使用されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーと異なるキメラオリゴヌクレオチドプライマー (イ) により処理して、D 鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、D 鎖の一本鎖に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(k) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(l) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より D 鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (k) の工程に再度利用される；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法、

[1 1] プライマーからの伸長が、鎖置換能を有する DNA ポリメラーゼにより行われることを特徴とする請求項 1 ～ 1 0 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[1 2] DNA ポリメラーゼが、大腸菌由来の DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 B s t DNA ポリメラーゼ、及びバチルス カルドテナックス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 B c a ポリメラーゼからなる群から選択される DNA ポリメラーゼである請求項 1 1 記載の核酸配列の増幅方法、

[1 3] 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる RNA を逆転写用プライマーにより処理して、逆転写酵素による逆転写反応を行い一本鎖の c DNA を調製し、さらに該 c DNA を鋳型となる核酸配列として少なくとも 1 種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーにより

処理して、該核酸配列の鎖に相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記キメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型となる核酸配列に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(b) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(c) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行う；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法、

[14] 2 種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる RNA を 2 種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマー（イ及びロとする）のうちの一方のキメラヌクレオチドプライマー（イ）より処理して、逆転写酵素による逆転写反応を行い一本鎖の cDNA を調製し、さらに該 cDNA を鋳型となる核酸配列として、もう一方のキメラオリゴヌクレオチドプライマー（ロ）により処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記（ロ）プライマーは、鋳型となる核酸配列に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(b) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；

(c) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が（b）の工程に再度利用され、；

(d) 上記工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として（a）で使用されたキメラオリゴヌクレオチドプライマー（ロ）と異なるキメラオリゴヌクレオチドプライマー（イ）により処理して、置換鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成

し、ここで前記プライマーは、置換鎖の一本鎖に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置され；

(e) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(f) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より置換鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (e) の工程に再度利用される；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法、

[15] さらにもう 1 種類の逆転写反应用プライマーを使用することを特徴とする請求項 13 又は請求項 14 記載の核酸配列の合成方法、

[16] 逆転写反应用プライマーがオリゴ dT プライマー、ランダムプライマーもしくは特異的プライマーからなる群より選択されるプライマーであることを特徴とする請求項 15 記載の核酸の増幅方法、

[17] プライマーからの伸長が、鎖置換能を有する DNA ポリメラーゼにより行われることを特徴とする請求項 13 ～ 16 記載の核酸配列の増幅方法、

[18] DNA ポリメラーゼが逆転写活性を有することを特徴とする請求項 13 ～ 17 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[19] DNA ポリメラーゼが、バチルス ステアロサーモフィラス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 B s t DNA ポリメラーゼ、及びバチルス カルドテナックス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 B c a DNA ポリメラーゼからなる群より選択される DNA ポリメラーゼであることを特徴とする請求項 18 記載の核酸配列の増幅方法、

[20] 逆転写反応に、トリ骨髄芽球症ウイルス由来の AMV RTase、モロニーネズミ白血病ウイルス由来の MMLV RTase、モロニーネズミ白血病ウイルス由来逆転写酵素であって RNase H 活性の欠失した変異体である Superscript II<sup>TM</sup> 及びラウス関連ウイルス 2 由来の RAV-2 RTase からなる群より選択される逆転写酵素を用いることを特徴とする請求項 13 ～ 17 いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[21] DNAポリメラーゼが、大腸菌由来のDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bst DNAポリメラーゼ、及びバチルス カルドテナックス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bcaポリメラーゼからなる群より選択されるDNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項20記載の核酸配列の増幅方法、

[22] 等温で行うことを特徴とする請求項9～21いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[23] 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) デオキシヌクレオチド3リン酸、鎖置換能を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも1種類の鋳型となる核酸配列の一本鎖に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼの切断のために配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマー、及び当該プライマーの伸長物を切断するエンドヌクレアーゼを鋳型となる核酸配列と混合し；そして

(b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物を反応させる、ことを特徴とする核酸配列の増幅方法、

[24] 2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有してなる請求項23記載の核酸配列の増幅方法、

[25] 鋳型となる核酸配列が、一本鎖DNA、2本鎖DNA由来のそれぞれの1本鎖、またはRNAから逆転写反応によって得られたcDNAからなる群より選択される核酸配列であることを特徴とする請求項23又は24いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[26] プライマーからの伸長が、鎖置換能を有するDNAポリメラーゼにより行われることを特徴とする請求項25記載の核酸配列の増幅方法、

[27] DNAポリメラーゼが、大腸菌由来のDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bst DNAポリメラーゼ、及びバチルス カルドテナックス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bcaポリメラーゼからなる群より選択されるDNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項26記載の核酸配列の増幅方法、

[28] エンドヌクレアーゼがエンドリボヌクレアーゼである請求項1～27いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[29] エンドリボヌクレアーゼがRNase Hである請求項28記載の核酸配列の増幅方法、

[30] エンドヌクレアーゼが耐熱性である請求項1～29記載いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[31] デオキシヌクレオチドの3'末端側にリボヌクレオチドが結合した構造を有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いることを特徴とする請求項1～30いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[32] 少なくとも1残基のリボヌクレオチドを含有し、その3'末端よりDNA鎖の伸長が可能なキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、リボヌクレアーゼの作用により上記リボヌクレオチド残基の3'末端側が切断されるよう設計されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用する請求項31記載の核酸配列の増幅方法、

[33] キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、RNase Hの作用によりリボヌクレオチド残基の3'末端側で切断されるよう設計された請求項32記載の核酸配列の増幅方法、

[34] キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、連続した2残基以上のリボヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項33記載の核酸配列の増幅方法、

[35] リボヌクレオチドが未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチドを含有する配列である請求項31～34いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[36] キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、修飾ヌクレオチドとしてリボヌクレオチド3リン酸の $\alpha$ 位のリン原子に結合している酸素原子を硫黄原子に置き換えた( $\alpha$ -S)リボヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項35記載の核酸配列の増幅方法、

[37] 請求項1～30のいずれかに記載の方法に用いるDNA増幅用のプライマーであって、デオキシヌクレオチドとリボヌクレオチドを含有することを特徴とするキメラオリゴヌクレオチドプライマー、

[38] デオキシヌクレオチドの 3' 末端側にリボヌクレオチドが結合した構造を有する請求項 37 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、

[39] 少なくとも 1 残基のリボヌクレオチドを含有し、その 3' 末端より DNA 鎖の伸長が可能なキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、リボヌクレアーゼの作用により上記リボヌクレオチド残基の 3' 末端側が切断されるよう設計された請求項 38 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、

[40] RNase H の作用によりリボヌクレオチド残基の 3' 末端側で切断されるよう設計された請求項 39 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、

[41] 連続した 2 残基以上のリボヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項 40 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、

[42] リボヌクレオチドが未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項 37～41 いずれかに記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、

[43] キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、修飾ヌクレオチドとしてリボヌクレオチド 3 リン酸の  $\alpha$  位のリン原子に結合している酸素原子を硫黄原子に置き換えた ( $\alpha$ -S) リボヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項 42 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、

[44] 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸配列を少なくとも 1 種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる核酸配列に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、RNase H の切断のために連続した 2 残基以上のリボヌクレオチドがプライマーの 3' 末端側に配置され；

(b) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖を RNase H で切断し；そして

(c) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より、鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行う；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法、

[45] 2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸配列の鎖を2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーのうちの1つにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる核酸配列に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、RNase Hの切断のために連続した2残基以上のリボヌクレオチドがプライマーの3'末端側に配置され；

(b) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(c) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より、鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む2本鎖核酸が(b)の工程に再度利用され、；

(d) 上記工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として(a)で使用されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーと異なるキメラオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、置換鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、置換鎖の一本鎖に実質的に相補的で、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、RNase Hの切断のために連続した2残基以上のリボヌクレオチドがプライマーの3'末端側に配置され；

(e) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(f) 上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より置換鎖の一本鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む2本鎖核酸が(e)の工程に再度利用される；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法、

[46] 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) デオキシヌクレオチド3リン酸、鎖置換能を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも1種類の鋳型となる核酸配列の一本鎖に実質的に相補的で、デオキシ

ヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドであって、当該リボヌクレオチドは、RNase Hの切断のために連続した2残基以上のリボヌクレオチドがプライマーの3'末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマー、及び当該プライマーの伸長物を切断するRNase Hを鋳型となる核酸配列と混合し；そして

(b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物を反応させる、  
ことを特徴とすると核酸配列の増幅方法、

[47] 2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有してなる請求項46記載の核酸配列の増幅方法、

[48] 鋳型となる核酸配列が、一本鎖DNA、2本鎖DNA由来のそれぞれの1本鎖DNA、またはRNAから逆転写反応によって得られたcDNAからなる群より選択される核酸配列であることを特徴とする請求項44～47いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[49] プライマーからの伸長が、鎖置換能を有するDNAポリメラーゼにより行われることを特徴とする請求項48記載の核酸配列の増幅方法、

[50] DNAポリメラーゼが、大腸菌由来のDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bst DNAポリメラーゼ、及びバチルス カルドテナックス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bcaポリメラーゼからなる群より選択されるDNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項49記載の核酸配列の増幅方法、

[51] 等温で行うことを特徴とする請求項23～50いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[52] 耐熱性のRNase Hを用いることを特徴とする請求項31～51いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[53] 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸配列を少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる核酸配列に実質的に相補的で、エンドヌクレアーゼの切断のためにリボヌクレオチドが配置され；



(b) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(c) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より、鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行う；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法、

[54] 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸配列の鎖を 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーのうちの 1 つにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鋳型となる核酸配列に実質的に相補的で、エンドヌクレアーゼの切断のためにリボヌクレオチドが配置され；

(b) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(c) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より、鋳型に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (b) の工程に再度利用され、；

(d) 上記工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として (a) で使用されたオリゴヌクレオチドプライマーと異なるオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、置換鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、置換鎖の一本鎖に実質的に相補的で、エンドヌクレアーゼの切断のためにリボヌクレオチドが配置され；

(e) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(f) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より置換鎖の一本鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (e) の工程に再度利用される；

ことを含んでなる核酸配列の増幅方法、

[55] 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) デオキシヌクレオチド 3 リン酸、鎖置換能を有する DNA ポリメラーゼ、

少なくとも1種類の鋳型となる核酸配列の一本鎖に実質的に相補的で、RNase Hにより切断されるための連続した2残基以上のリボヌクレオチドがプライマーの3'末端側に配置されたオリゴヌクレオチドプライマー、及び当該プライマーの伸長物を切断するRNase Hを鋳型となる核酸配列と混合し；そして

(b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物を反応させる、  
ことを特徴とすると核酸配列の増幅方法、

[56] 2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを含有してなる請求項55記載の核酸配列の増幅方法、

[57] 未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチドで構成されたオリゴヌクレオチドを使用することを特徴とする請求項53～56いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[58] 鋳型となる核酸配列が、一本鎖DNA、2本鎖DNA由来のそれぞれの1本鎖DNA、またはRNAから逆転写反応によって得られたcDNAからなる群より選択される核酸配列であることを特徴とする請求項53～57いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、

[59] プライマーからの伸長が、鎖置換能を有するDNAポリメラーゼにより行われることを特徴とする請求項58記載の核酸配列の増幅方法、

[60] DNAポリメラーゼが、大腸菌由来のDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bst DNAポリメラーゼ、及びバチルス カルドテナックス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bcaポリメラーゼからなる群より選択されるDNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項59記載の核酸配列の増幅方法、

[61] 等温で行うことを特徴とする請求項53～60いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、及び

[62] 耐熱性のRNase Hを用いることを特徴とする請求項53～61いずれかに記載の核酸配列の増幅方法、に関する。

【0011】

本発明者らは鋭意研究の結果、好適には、リボヌクレアーゼにより3'末端側が切断され得るプライマー、エンドリボヌクレアーゼ、及びDNAポリメラーゼの

存在下に目的とする領域のDNAを増幅する方法を見出し、優れた遺伝子増幅反応系を構築し、本発明を完成するに至った。該方法は、等温条件下、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いる核酸配列の増幅 (Isothermal chimeric primer amplification of nucleic acid) 法であり、以下、ICAN法と称す。

【0012】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明に使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマー及びオリゴヌクレオチドプライマー

本明細書に記載のデオキシヌクレオチドとは、デオキシリボヌクレオチド3リン酸 (本明細書中では、dNと称す) のことをいい、例えば、dATP、dTTP、dCTP、dGTPが挙げられる。

【0013】

本明細書に記載のリボヌクレオチド (本明細書中では、Nと称す) とは、リボヌクレオチド3リン酸のことをいい、たとえばATP、UTP、CTP、GTPが挙げられる。さらに該リボヌクレオチドにはこれらの誘導体、特に限定するものではないが、例えば $\alpha$ 位のリン酸基の酸素原子を硫黄原子に置き換えたリボヌクレオチド ( $\alpha$ -チオリボヌクレオチド、以下 ( $\alpha$ -S) NTP、あるいは ( $\alpha$ -S) Nと記載する。) 等も含まれる。

【0014】

本発明の方法において、使用されるオリゴヌクレオチドプライマーには、デオキシヌクレオチド及びリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマー、あるいは未修飾リボヌクレオチド及び/又は修飾リボヌクレオチドで構成されたオリゴリボヌクレオチドプライマーも含まれる。

【0015】

本発明の方法において、使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマー及びオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型DNAに実質的に相補的な塩基配列を有し、その3'末端よりDNA鎖の伸長が可能であり、さらにエンドヌクレアーゼにより本発明のDNA合成反応中に結果的に3'末端で切断される部位を有するもの

であれば良い。なお、ここで「実質的に相補的な塩基配列」とは、使用される反応条件、例えばストリンジェントな条件において鋳型となるDNAにアニーリング可能な塩基配列を意味する。このようなキメラオリゴヌクレオチドプライマーあるいはオリゴヌクレオチドプライマーの設計は、当業者に公知であり、例えば、ラボマニュアルPCR（宝酒造、第13頁～第16頁、1996年）を参考に設計することができる。

【0016】

本発明を何ら限定するものではないが、例えば、下記一般式で表す構造をもつオリゴヌクレオチドが本発明のDNA合成方法に使用することができる。

一般式： $5' - (dN) a - [(\alpha - S)N] b - N c - dN e 3'$

(a: 15以上の整数、b: 0又は1以上の整数、c: 0又は1以上の整数、e: 0又は1以上の整数、dN: デオキシリボヌクレオチド、 $(\alpha - S)N$ :  $\alpha$ -チオ-リボヌクレオチド、N: リボヌクレオチド)

さらに例えば、当該オリゴヌクレオチドプライマーの3'末端付近に、 $-(\alpha - S)N - N$ 、 $-(\alpha - S)N - [(\alpha - S)N]$ 、 $-N - N$ 、若しくは $-(\alpha - S)N - N - dN - dN$ 等の構造を有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーが好適に使用できる。

【0017】

このような修飾されたりボヌクレオチド3リン酸としては、例えば、米国特許第5003097号記載の硫化反応試薬（グレンリサーチ社製）を用いた方法で調製した $\alpha - S$ リボヌクレオチド3リン酸、あるいは2-OMe-RNA-CE

ホスホアミダイド試薬（グレンリサーチ社製）を用いる、リボースの2位の水酸基が $-OCH_3$ になっているリボヌクレオチド3リン酸等が挙げられる。

【0018】

本発明のDNA合成反応中において、DNAポリメラーゼで伸長したDNA鎖を鎖置換（ストランドディスプレイメント、strand displacement）できるように、例えば、本発明のオリゴヌクレオチドプライマーの3'末端側で切断されるような構造を持つものであれば、本発明に使用されるオリゴヌクレオチドプライマーに含まれる。また、本発明のオリゴヌクレオチドプライマーには、反応開始

時にオリゴヌクレオチドプライマーの3'末端で切断されるような構造を持つもの、例えば、キメラオリゴヌクレオチドプライマーに含有されるリボヌクレオチド配列の3'末端で切断されるような構造を持つものが挙げられる。さらに反応開始後オリゴヌクレオチドプライマーの3'末端で切断されるような構造を持つようになるもの、例えば、キメラオリゴヌクレオチドプライマーに含有されるリボヌクレオチド配列の3'末端で切断されるような構造を持つようになるもののいずれもが含まれる。例えば、鋳型DNAにアニーリングした、上記の一般式で表されるオリゴヌクレオチドプライマーよりDNAの伸長を行って生成した二本鎖DNAにRNase Hを作用させた場合には、上記オリゴヌクレオチドプライマーのリボヌクレオチド部分のみが切断され、上記オリゴヌクレオチドプライマーと伸長により合成されたDNA鎖の間にニックの入った二本鎖DNAが生じる。

## 【0019】

本発明の方法で使用するオリゴヌクレオチドプライマーは、増幅後のDNA断片を1本鎖もしくは2本鎖のいずれの形態で得たいかによって1種類もしくは2種類を使い分けることができる。

## 【0020】

本発明の方法において使用されるオリゴヌクレオチドプライマーは約15ヌクレオチドから約100ヌクレオチドの長さのプライマー好ましい。さらに好ましくは、約20ヌクレオチドから約40オリゴヌクレオチドの長さのプライマーである。この配列はストリンジェントな条件においてアニーリングするように、実質的に標的物の配列に相同であることが好ましい。該オリゴヌクレオチドプライマーは、後の段階で使用されるエンドヌクレアーゼにより認識される配列(3'末端付近に)をも含む。

## 【0021】

本発明において使用される「特異的プライマー」とは、RNAを鋳型として逆転写反応をする際に用いる逆転写用プライマーであって、鋳型となるRNAに相補的な配列を有し、cDNA合成に使用できる特異性のあるものを意味し、上記のようなオリゴヌクレオチドプライマーでなくとも良い。

## 【0022】

上記逆転写用プライマーは、鋳型RNAに相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであり、使用される反応条件において鋳型RNAに対してアニールするものであれば特に限定されるものではない。該プライマーはオリゴdT（デオキシチミンヌクレオチド）プライマー等のオリゴヌクレオチドプライマーやランダムな配列を有するオリゴヌクレオチドプライマー（ランダムプライマー）であっても良い。該逆転写用プライマーの長さは、特異的なアニーリングを行う観点から、好ましくは6ヌクレオチド以上であり、更に好ましくは10ヌクレオチド以上であり、オリゴヌクレオチドの合成の観点から、好ましくは100ヌクレオチド以下であり、更に好ましくは30ヌクレオチド以下である。

## 【0023】

これらのオリゴヌクレオチドプライマー及び逆転写用プライマーは、任意の核酸配列を持つように、例えばABI社（Applied Biosystem Inc.）のDNAシンセサイザー394型を用いて、ホスホアミダイト法により合成できる。別法としてリン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスホネート法等があるが、いかなる方法で合成されたものであっても良い。

## 【0024】

## （2）本発明に使用されるエンドヌクレアーゼ

本発明に使用されるエンドヌクレアーゼとは、鋳型DNAにアニーリングした、上記（1）に記載のオリゴヌクレオチドプライマーよりDNAの伸長を行って生成した二本鎖DNAに作用して、上記オリゴヌクレオチドプライマーのリボヌクレオチド部分の3'末端を特異的に切断するものであればよい。即ち、上記の2本鎖DNAのうちのオリゴヌクレオチドプライマー部分にニックを生成する酵素である。特に限定されるものではないが、例えば、本発明にはリボヌクレアーゼが使用でき、特にエンドリボヌクレアーゼH（RNase H）が好適に使用できる。また、該リボヌクレアーゼには、上記作用を有するものであれば、常温性リボヌクレアーゼ、中温性リボヌクレアーゼ、及び耐熱性リボヌクレアーゼのいずれもが好適に本発明に使用でき、該リボヌクレアーゼは、天然体及び変異体のいずれでも良い。例えば、市販のHybridase<sup>TM</sup> Thermostable RNaseH（エピセンタールテクノロジー社製）も好適に使用できる。

【0025】

本明細書において使用されている「ニックを入れる」もしくは「ニックング」という単語は、DNA-RNAハイブリッド2本鎖のうちのリボヌクレオチドを含む鎖のリボヌクレオチド部分を選択的に切断することを意味する。

【0026】

(3) 本発明に使用されるDNAポリメラーゼ

本発明に使用されるDNAポリメラーゼは、DNA鎖を置換 (strand displacement) する活性を有するものを使用することができる。また、実質的に5'→3' エキソヌクレアーゼ活性を有しないものが特に好適に使用することができる。特に限定するものではないが、例えば、バチルス・カルドテナックス (*Bacillus caldotenax*、以下、B. c a と称す) やバチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*、以下B. s t と称す) 等の好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼの5'→3' エキソヌクレアーゼ活性を欠失した変異体や、大腸菌 (以下、E. c o l i と称す) 由来DNAポリメラーゼIのらージ フラグメント (クレノウフラグメント) 等が挙げられる。また、本発明に使用できるDNAポリメラーゼは、常温性、中温性、もしくは耐熱性のいずれのものも好適に使用できる。該DNAポリメラーゼは、上記作用を有するものであれば、天然体もしくは変異体のいずれも好適に使用できる。

【0027】

(4) 本発明の核酸配列の増幅方法

本発明の方法は、上記(1)に示されたオリゴヌクレオチドプライマーを少なくとも1種類使用し、さらに上記(2)に示されたりボヌクレアーゼ及び上記(3)に示されたDNAポリメラーゼを組合わせて実施することができる。当該方法では、DNA合成に使う塩基は、PCR法等に使われるdNTPが好適に使用できる。また、当該方法では、オリゴヌクレオチドプライマー、例えば、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用するが、このプライマーは、例えば、DNA合成機等を用いて、通常の合成方法と同様に調製することができる。

【0028】

本発明の方法において鋳型となるDNA及びRNAは、鋳型となる核酸配列を

含むと推定されているどのような試料からも単離することができる。このような核酸を含む試料には特に限定はないが、例えば、細胞、組織、血液のような生体由来試料、食品、土壌、排水のような生物を含有する可能性のある試料が挙げられる。また、前記試料等を公知の方法で処理することによって得られる核酸含有調製物であっても良い。該調製物としては、例えば細胞破碎物やそれを分画して得られる試料、該試料中の核酸、あるいは特定の核酸分子群、例えば、mRNAを富化した試料等が本発明に使用できる。さらに公知方法で増幅されたDNAあるいはRNA等の核酸等も好適に使用できる。

## 【0029】

本発明の方法に適用することができるRNAとしては特に制限はなく、試料中の全RNA、mRNA、tRNA、rRNA等のRNA分子群、あるいは特定のRNA分子群が挙げられ、逆転写反応に使用されるプライマーが作成可能な任意のRNAが挙げられる。

## 【0030】

これら材料からの核酸の単離は、あらゆる方法により行うことができる。そのような方法は、洗浄剤による溶解物、音波処理、ガラスビーズを用いた振盪攪拌およびフレンチプレスの使用を含む。幾つかの例において、単離された核酸を精製することが有利である（例えば、内在性ヌクレアーゼが存在するとき）。これらの例において、核酸の精製はフェノール抽出、クロマトグラフィー、イオン交換、ゲル電気泳動または密度に依存した遠心分離により実施される。

## 【0031】

上記方法により単離したゲノムDNAやPCRフラグメントのような2本鎖DNA、及び全RNA若しくはmRNAから逆転写反応で調製されたcDNAのような1本鎖DNAのいずれもが本発明において鋳型DNAとして好適に使用できる。上記2本鎖DNAの場合は、1本鎖DNAに変性する工程（デネーチャー）によって得られる好適に使用できる。さらに、本発明のDNAの合成方法は、B・c a由来のDNAポリメラーゼを使うことにより、トータルRNA若しくはmRNAからの逆転写反応とcDNAを鋳型にしたDNAポリメラーゼ反応を1種類のポリメラーゼで行なうことができる。



## 【0032】

上記鑄型の長さは、標的配列がその断片中に完全に含まれるか、または標的配列の十分な部分が少なくとも断片中に存在することにより、プライマー配列の十分な結合を提供するようなものがよい。

## 【0033】

本発明に用いられる逆転写活性を有する酵素としては、RNAを鑄型としたcDNA合成活性を有するものであれば特に限定はなく、例えばトリ骨髄芽球症ウイルス由来逆転写酵素 (AMV RTase)、モロニーネズミ白血病ウイルス由来逆転写酵素 (MMLV RTase)、ラウス関連ウイルス2逆転写酵素 (RAV-2 RTase) 等、種々の起源の逆転写酵素が挙げられる。このほか、逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼを使用することもできる。また、本発明の目的のためには、高温で逆転写活性を有する酵素が好適であり、例えばサーマス属細菌由来DNAポリメラーゼ (Tth DNAポリメラーゼ等)、バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼ等を使用できる。特に限定はないが、例えば、好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼが好ましく、B. st 由来DNAポリメラーゼ (Bst DNAポリメラーゼ)、更にB. ca 由来DNAポリメラーゼ (以下、Bca DNAポリメラーゼと記載する) が好ましい。例えば、Bca DNAポリメラーゼは、反応にマンガンイオンを必要とせず、また、高温条件下で鑄型RNAの二次構造形成を抑制しながらcDNAを合成することが出来る。

## 【0034】

B. ca は生育至適温度が約70℃である好熱性細菌であり、この細菌由来のBca DNAポリメラーゼは、DNA依存DNAポリメラーゼ活性、RNA依存DNAポリメラーゼ活性 (逆転写活性)、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を持つことが知られている。

## 【0035】

これらの酵素はその本来の起源より精製して取得されたもの、あるいは遺伝子工学的に生産された組み換え蛋白質の何れであっても良い。また、該酵素は、遺伝子工学的あるいはその他の手法によって置換、欠失、付加、挿入等の改変を加

えたものであっても良く、該改変された酵素として例えば5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠損させたBca DNAポリメラーゼであるBcaBEST DNAポリメラーゼ等が挙げられる。

【0036】

本発明の方法は、鋳型DNAが2本鎖DNAの場合、それらを変性して一本鎖にすることにより鋳型DNA鎖へのプライマーの結合を可能にさせる。反応温度を約95℃に上昇させることは、好ましい核酸変性法である。他の方法はpHの上昇を含むが、オリゴヌクレオチドプライマーを標的物に結合させるためにpHを低下させる必要がある。上記のような2本鎖を1本鎖DNAに変性する工程、もしくは、鋳型がRNAの場合、逆転写反応によりcDNA（1本鎖DNA）を調製する工程の後、下記の工程が並行して連続し、繰返し起こることを特徴としている。

【0037】

[1] 鋳型となるDNAが1種もしくは2種のオリゴヌクレオチドプライマーとアニーリングする工程。

[2] プライマーの3'末端からDNA伸長反応を行なう工程。

[3] プライマーの3'末端と[2]で伸長したDNA鎖の間を切断する工程。

[4] [3]の切断した部位より伸長したDNA鎖を分解することなく除去しながら、オリゴヌクレオチドの3'末端からDNA伸長反応を行なう工程。

[5] [4]の工程で得られた二本鎖ポリヌクレオチドを用いて[1]～[4]の工程を繰り返す工程。

【0038】

上記反応系は、常温でも実施できるが、耐熱性のエンドヌクレアーゼ、例えば耐熱性RNaseH、及び耐熱性DNAポリメラーゼ、例えばBcaBEST DNAポリメラーゼを組合わせて、高温で実施することによりDNA増幅時の特異性をあげることもできる。さらに該方法においては、逆転写反応及び核酸配列の増幅も連続して行なう態様も可能であり、上記酵素に耐熱性の逆転写酵素や、逆転写活性を持つDNAポリメラーゼを組合わせて、RNAからDNAを合成することができる。

【0039】

なお、本明細書においては、「連続的に」とは、上記の各工程が、反応系内で並行して起こっていることを意味する。

【0040】

本発明の方法において「等温」とは、酵素及び核酸鎖が実質的に上記各工程において機能する温度条件下のことを言う。

【0041】

本明細書において第1の発明は：

一本鎖のDNAを鋳型として、少なくとも1種類の本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行なう核酸配列の増幅方法である。

本明細書において第2の発明は：

一本鎖のDNAを鋳型として、2種類の本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行なう核酸配列の増幅方法である。

本明細書において第3の発明は：

二本鎖のDNAを鋳型として、少なくとも1種類の本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行なう核酸配列の増幅方法である。

本明細書において第4の発明は：

二本鎖のDNAを鋳型として、2種類の本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行なう核酸配列の増幅方法である。

本明細書において第5の発明は：

RNAを鋳型として、少なくとも1種類の本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行なう核酸配列の増幅方法である。

【0042】

1 本鎖鋳型DNAの存在下において、それに相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーが結合する。DNAポリメラーゼの存在下において、キメラデオキシヌクレオチドを鋳型核酸配列の残りの長さに沿って該プライマーの3'末端に付加し、該キメラオリゴヌクレオチドプライマー配列に沿って3'末端に鋳型となるDNA鎖に相補的な核酸配列のキメラデオキシヌクレオチドを付加しながら伸長する。次にエンドリボヌクレアーゼはキメラオリゴヌクレオチドプライマー

のリボヌクレオチド配列の3'末端側を切断するが、鋳型となる核酸配列の相補配列部分は切断しない。即ち、上記の2本鎖産物にニックを入れるニックング酵素として作用する。本発明に使用されるDNAポリメラーゼは、鎖置換能を有するため該プライマーの切断部の3'側からDNA鎖を再伸長すると同時にニックの5'末端から下流を置換して、鋳型となる核酸配列に相補的な置換鎖を生成する。

#### 【0043】

本発明において、2種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使う場合においてその1種類が上記置換鎖に相補的な場合、上記置換鎖を鋳型として上記と同様な鎖置換反応が並行して進行する。

本発明の方法においてキメラオリゴヌクレオチドが好適に使用できるが、さらに未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチドで構成されたオリゴヌクレオチドプライマーにおいても好適に使用できる。

#### 【0044】

本発明の方法において、「鎖置換能」とは、鋳型となる核酸配列に従って複製をする際、鎖を置き換えながら進行し、特定の相補鎖を遊離させる、即ち鎖置換(strand displacement) することができる能力のことをいう。

本発明の方法において、「置換鎖」とは、鎖置換により鋳型となる核酸配列から遊離したDNA鎖のことを言う。

#### 【0045】

本発明の方法において、「再生されたプライマー伸長鎖」とは、鎖置換により新たに複製に用いられた本発明のオリゴヌクレオチドプライマーから伸長した鋳型となる核酸配列に相補的なDNA鎖のことを言う。

本発明の方法において、「再度利用され」とは、鋳型となる核酸配列と再生されたプライマー伸長鎖で構成された2本鎖DNAを再度鎖置換の工程に利用することを言う。

#### 【0046】

この方法は、2種のオリゴヌクレオチドプライマーを用いても機能できるため、その場合1種のオリゴヌクレオチドプライマーは鋳型となる核酸配列の一方の

DNA鎖に結合し、そして他方のオリゴヌクレオチドプライマーは上記の鋳型となる核酸配列に相補的な核酸配列を有する鎖に結合する。この態様を使用すると、各反応産物が他のプライマーのための鋳型として機能できることは明らかである。このようにして、増幅産物が増加していく。さらに、本発明の方法においてキメラオリゴヌクレオチドが好適に使用できるが、さらに未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチドで構成されたオリゴヌクレオチドプライマーにおいても好適に使用できる。

## 【0047】

核酸を変性する前または後に、4つのすべてのデオキシヌクレオチド3リン酸、ポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼからなる混合物を添加する。（高温により核酸を変性し、高温耐性の酵素を使用しないのならば、変性後に酵素を添加することが好ましい。）

目的とするDNA断片の生成および本発明の方法のための反応成分からなる混合物は、場合によりNMP（1-メチル2ピロロリジノン）、グリセロール、ポリ（エチレングリコール）、ジメチルスルフォキシドおよび／またはホルムアミドを含んでもよい。そのような有機溶媒の含有はオリゴヌクレオチドプライマーの非特異的なアニーリングを軽減する助けとなると信じられている。

## 【0048】

上記（2）に記述されたように、この方法において使用されるエンドヌクレアーゼは、プライマーのリボヌクレオチド部分において鎖を切断するように選択すべきである。さらにDNAポリメラーゼは、合理的な速度でニックの入ったDNA鎖を解離させるように選択されるべきである。

## 【0049】

この方法に有用なDNAポリメラーゼは、5'から3'方向に伸長を開始するものを含む。該DNAポリメラーゼはニック下流からの伸長鎖生成に従い、置換もすべきであり、そして重要なことはあらゆる5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠いているべきである。このようなDNAポリメラーゼ、例えばDNAポリメラーゼIのクレノウ断片およびDNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠損クレノウ断片、Bstポリメラーゼ由来の同様の断片（バイオラッド社、リッ

チモンド、CA)、B. ca由来のBcaBEST DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)が有用である。シークエネース1.0およびシークエネース2.0(米国バイオケミカル社)、T5 DNAポリメラーゼおよび $\phi$ 29 DNAポリメラーゼも使用することができる。通常エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼは、その活性がブロッキング剤の添加によりブロックされるとそのような活性を失ったと見なされうる場合は、本発明のDNA合成方法に使用できる。

## 【0050】

本発明のDNA合成方法のさらなる特徴は、合成において温度を上げ下げする必要がないこと、即ち等温での核酸配列の合成方法を提供する。多くの増幅法は、温度を上下することにより合成鎖から標的物を解離する必要がある。

## 【0051】

しかし、本発明の方法においては、変性後に単一の温度を使用することができる。非特異的な結合を最少にするために反応温度を十分に高く、しかし鋳型となる核酸配列にプライマーが結合する時間を最少にするように反応温度を十分に低く、ストリンジェンシーのレベルを設定すべきである。さらに、適当な温度により酵素活性を十分に保護すべきである。このため、該温度は、好ましくは、約20℃から約70℃であり、さらに好ましくは、約35℃から約65℃にするのがよい。

## 【0052】

本発明のDNA合成方法において、既に一本鎖にされている鋳型DNAに対し、オリゴヌクレオチドプライマーが特異的に結合し、そしてDNAポリメラーゼ、デオキシヌクレオチド3リン酸の存在下においてオリゴヌクレオチドプライマーから鋳型となる核酸配列の長さに従い、該プライマー配列を通して伸長合成される。エンドリボヌクレアーゼ、例えば、RNase Hの存在下において、該プライマー伸長鎖はリボヌクレオチドとデオキシヌクレオチドの間で切断される。5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠くDNAポリメラーゼの存在下において、3'末端の切断面から伸長合成され、置換鎖は、切断末端から鋳型に相補的な核酸配列を有しながら遊離することにより生成される。それと並行して、新しいプライマー伸長鎖が合成される。2種のオリゴヌクレオチドプライマーを使用す

る場合は、遊離した置換鎖も本発明の方法の鑄型になりうる。

【0053】

本発明の方法を用いて、2本鎖DNAを鑄型とし、2種のオリゴヌクレオチドプライマーを使用した場合は、鑄型となる2本鎖DNAを2種類の相補的な1本鎖DNA（A鎖及びB鎖）に変性する前処理をした後に下記の各工程が連続して起こる。

（a）上記のA鎖1本鎖DNAを鑄型となる核酸配列として少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鑄型となるA鎖の核酸配列に実質的に相補的で3'末端側にエンドヌクレアーゼによる切断ための部位を有し；

（b）上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；

（c）上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点よりA鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む2本鎖核酸が（b）の工程に再度利用され、；

（d）上記工程で得られる遊離した置換鎖C鎖を鑄型として（a）で使用されたプライマーと異なるプライマーにより処理して、C鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、C鎖の一本鎖に実質的に相補的で3'末端側にエンドヌクレアーゼによる切断ための部位を有し；

（e）上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；

（f）上記工程で得られる2本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点よりC鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む2本鎖核酸が（e）の工程に再度利用され、；

（g）上記の鑄型となるもう一方の1本鎖DNAのB鎖については、B鎖1本鎖DNAを鑄型となる核酸配列として少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、鑄型となるB鎖の核酸配列に実質的に相補的で3

’ 末端側にエンドヌクレアーゼによる切断のための部位を有し；

(h) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；

(i) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より B 鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (h) の工程に再度利用され、；

(j) 上記工程で得られる遊離した置換鎖 D 鎖を鋳型として (g) で使用されたプライマーと異なるプライマーにより処理して、D 鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで前記プライマーは、D 鎖の一本鎖に実質的に相補的で 3’ 末端側にエンドヌクレアーゼによる切断のための部位を有し；

(k) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖をエンドヌクレアーゼで切断し；そして

(l) 上記工程で得られる 2 本鎖核酸のプライマー伸長鎖の切断点より D 鎖に相補的な核酸配列の鎖置換を行い、再生されたプライマー伸長鎖を含む 2 本鎖核酸が (k) の工程に再度利用される。

#### 【0054】

また、本発明の方法において、逆転写酵素活性を持つ DNA ポリメラーゼ、例えば、BcaBEST DNA ポリメラーゼを使用すると鋳型となる RNA から cDNA を調製する工程を含む核酸配列の増幅方法として好適に使用できる。また、RNA から cDNA を調製する工程を独立させて行い、その生成物を本発明の方法に使用することもできる。

いずれの場合においても、本発明の方法においては、鎖置換において置換合成する反応を停止させるかまたは試薬のうちのひとつが使い尽くされるかのいずれかまで繰り返される。

#### 【0055】

図 1 は、一本鎖 DNA を鋳型にし、2 つのプライマーを使用する場合を描写したものである。各工程を下記に示すが、各工程は並行して連続して行われる。

#### 【0056】

(1) 鋳型となる DNA と 1 つのオリゴヌクレオチドプライマーがアニーリング



する工程。

(2) プライマーの3'末端からDNA伸長反応を行ない、プライマー伸長鎖ができる工程。

(3) プライマーの3'末端側のエンドヌクレアーゼで切断される部位にエンドヌクレアーゼを用いて切断する工程

(4) (3)の切断した部位よりDNAポリメラーゼにより鎖置換する工程

(5) (4)の工程で得られた鋳型及び再生されたプライマー伸長鎖の2本鎖DNAが(3)の工程に再度利用され、また遊離した置換鎖は、本発明の方法の鋳型となる工程

(6) (5)の工程の遊離した置換鎖を鋳型として(1)と異なるオリゴヌクレオチドプライマーがアニーリングする工程。

(7) プライマーの3'末端からDNA伸長反応を行ない、プライマー伸長鎖ができる工程。

(8) プライマーの3'末端側のエンドヌクレアーゼで切断される部位にエンドヌクレアーゼを用いて切断する工程

(9) (8)の切断した部位よりDNAポリメラーゼにより鎖置換する工程

(10) (9)の工程で得られた鋳型及び再生されたプライマー伸長鎖が(8)の工程に再度利用される工程。

#### 【0057】

2本鎖DNAが鋳型の場合は、1本鎖DNAの変性の後、それぞれのDNA鎖が上記工程(1)の鋳型になる。従って、得られる増幅産物の量は、1本鎖のDNAを鋳型にする場合よりも多く、また増幅産物の検出においては、1本鎖DNAを鋳型にする場合よりも短時間で行なうことができる。

#### 【0058】

本発明の方法を使用することにより、DNAチップに固定するための1本鎖DNA、塩基配列決定のための一本鎖DNAプローブ、または長鎖PCR法のためのメガプライマーを容易にしかも短時間に作製することができる。

上記目的のために本発明の方法においては、1つのオリゴヌクレオチドプライマー、あるいは2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用する場合のいずれの場

合においても作製できるが、例えば、2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いる場合は、一方のオリゴヌクレオチドプライマー量を他方の量に対して過剰にして増幅反応を行なう、いわゆるアシンメトリック（非対称）-PCR法において採用される方法と同様のプライマー比率によって行なうことができる。この結果、一方の鎖を置換した産物の量が、他方の鎖を置換した産物の量に比べて過剰になる。

## 【0059】

そして本発明の方法により得られた増幅物の存在は、多くのあらゆる方法により検出できる。一つの方法は、ゲル電気泳動による特定のサイズの反応産物の検出である。この方法では、例えば、エチジウムブロマイド等の蛍光物質により検出できる。他の方法としては、ビオチンのような物理的な標識を用いた標識ヌクレオチドの使用を含む。そして増幅産物中のビオチンは、蛍光標識されたアビジンあるいは、ペルオキシダーゼのような酵素に結合したアビジンによる検出方法に用いることができる。

## 【0060】

本発明はさらに、上述の方法により生じた反応産物の分離法および／または検出法に関する。この分離法は、磁気的な分離、膜による捕捉および固形支持体上での捕捉を含む。各方法において、捕捉モイエティは磁気ビーズ、膜または固形支持体に結合される。そしてビーズ、膜または固形支持体について、反応産物の存在または不在をアッセイできる。捕捉モイエティの例は、生成された反応産物に相補的な核酸配列およびプライマーまたは反応産物に取り込まれるリセプターに対する抗体を含む。分離系は検出系と連動していてもしていなくてもよい。

## 【0061】

本発明の実施において有用である検出系は、分離を要しない均一な系（ホモジニアスシステム）および不均一な系（ヘテロジニアスシステム）等が挙げられる。各系において、ひとつまたは複数の検出マーカーが使用され、好ましくは自動化された方法により、検出系からの反応または放射が監視される。均一な系の例は、蛍光偏光、酵素を介するイムノアッセイ、蛍光エネルギー転移、ハイブリダイゼーション保護（例えばアクリジニウムルミネッセンス）およびクローン化さ

れた酵素のドナーイムノアッセイを含む。不均一な系の例は、酵素標識（例えばペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびベータガラクトシダーゼ）、蛍光標識（例えば酵素標識および直接の蛍光標識〔例えばフルオレセインおよびローダミン〕）、ケミルミネッセンスおよびバイオルミネッセンスを含む。リポソームまたは他の袋状粒子も染色剤または他の検出可能なマーカーにより満たされて、そのような検出系において使用されうる。これらの系において、検出可能なマーカーは直接または間接に捕捉モイエティに結合でき、また反応産物は、リガンドにより認識されうるレセプターの存在下において生成することができる。

#### 【0062】

本発明のDNA合成方法では、特定のサーマルサイクラーを必要とせず、キメラプライマーを1種類もしくは2種類と従来法より使用数を少なくすることができ、使用する塩基もPCR等で用いられるものを流用できるため、ランニングコストを従来法よりも低くすることができる。そのため、ルーチンワークを行なっている遺伝子検査等の分野で好適に使用できる。

#### 【0063】

本発明において増幅されたDNA断片は、通常の塩基により構成されるためDNA増幅後、増幅断片内部の制限酵素部位を用いて適当なベクターにサブクロニングすることができる。さらにRFLPのような制限酵素を用いた処理をすることも問題なくでき、遺伝子検査の分野においても広く利用できる。また、本発明において増幅されたDNA断片は、通常の塩基により構成されるため、増幅断片中にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を組込んでおけば、増幅断片から直接RNAを合成することができ、それは、RNAプローブとして使用可能である。

#### 【0064】

さらに、本発明においては、通常の塩基の代わりに蛍光標識された塩基を使用することができ、容易に蛍光標識されたDNAプローブを作製することができる。

#### 【0065】

本発明の方法により増幅された 1 本鎖 DNA は、DNA チップ上に固定する DNA 断片として好適に使用できる。即ち、本発明の方法は、DNA チップ作製において固定化する DNA 鎖を調製する方法として好適に使用できる。

#### 【0066】

##### 【実施例】

本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

#### 【0067】

##### 実施例 1

##### (1) 鋳型 DNA とプライマーの合成

本実施例に鋳型として使用した 99 塩基の一本鎖 DNA 及びプライマーは、DNA 合成機（アプライド バイオシステム社製）を用いて合成した。配列表の配列番号 1 に上記の 99 塩基の一本鎖 DNA の塩基配列を示す。また、配列表の配列番号 1 及び 2 に、それぞれ上流プライマー及び下流プライマーの基本的な塩基配列を示す。本実施例に使用されたプライマーの詳細な構造を以下に示す。

#### 【0068】

プライマー対 1：配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列を有し、その全体がすべてデオキシリボヌクレオチドで構築されたプライマーの組み合わせ。

プライマー対 2：プライマー対 1 のプライマーの、それぞれの 3' 末端から 2 個のデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換され、かつ 3' 末端から 2 個めリボヌクレオチドの 5' 側リン酸結合がホスホロチオエート結合に置換されたプライマーの組み合わせ。

プライマー対 3：プライマー対 1 のプライマーの、それぞれの 3' 末端のデオキシリボヌクレオチドのみがリボヌクレオチドに置換され、かつ当該リボヌクレオチドの 5' 側リン酸結合がホスホロチオエート結合に置換されたプライマーの組み合わせ。

プライマー対 4：プライマー対 1 のプライマーの、それぞれの 3' 末端から 2 個のデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換されたプライマーの組み合わせ。

プライマー対5：モデル1のプライマーのそれぞれの3'末端から3、4個めのデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換され、かつ3'末端から4個めリボヌクレオチドの5'側リン酸結合がホスホロチオエート結合に置換されたプライマーの組み合わせ。

【0069】

(2) 増幅反応

5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠損させたバチルス・カルドテナックス由来のDNAポリメラーゼであるBcaBEST DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）と、大腸菌由来のRNaseHであるcloned リボヌクレアーゼH（宝酒造社製）を用いて、以下のモデル1～7の反応系について検討した。

【0070】

反応液は、下記のように調製した。

35mM トリス塩酸バッファー（pH7.5）、0.1mg/ml BSA（牛血清アルブミン）、2.7% グリセロール、5% ジメチルスルオキシド、各1.4mM dNTP混合物、10mM 塩化マグネシウム、それぞれ20pmolの(1)のプライマー対もしくはその一方のプライマー、ならびに0.6ngの合成一本鎖鋳型DNA、5UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、60Uのcloned リボヌクレアーゼH、反応液の最終容量50μl。

上記反応液を均一に混合し、55℃、60分間保温した後、90℃、2分間加熱して酵素を失活させた。その後、各反応液の8μlを3% ヌシーブ 3:1 アガロース（宝酒造社製）ゲルにて電気泳動を行なった。以下に各モデルに使用されたプライマーを示す。

【0071】

モデル1～5：それぞれプライマー対1～プライマー対5を使用

モデル6：プライマー対2のうちの下流プライマーのみを使用

モデル7：プライマー対4を使用し、RNaseHを添加しない

【0072】

その結果、モデル2～5の反応液を使用した場合、74bの一本鎖DNA断片と49bの一本鎖DNA断片とが2本鎖を形成していると推測されるバンドが電

電気泳動にて確認され、これらの反応系でDNAが増幅されることが明らかとなった。また、一方のプライマーのみを使用したモデル6においても、予想される74 bの増幅断片（一本鎖DNA断片）が確認できた。なお、モデル1及び7の反応ではDNAの増幅はまったく認められなかった。

【0073】

### （3）増幅産物の確認

上記（2）の、モデル4の反応によって得られた反応液をマイクロコン-100（宝酒造社製）を用いてろ過した後、フィルターにトラップされた増幅DNA断片を回収した。該DNA断片の塩基配列をジデオキシ法により解析した。その結果、上記の反応によって増幅された断片が鋳型DNAと同じ塩基配列を持つDNAである事が確認された。

【0074】

### （4）反応時間の検討

上記（2）のモデル2の反応液を調製し、これを種々の時間反応させた場合の増幅産物量の変化を調べた。当該反応液を、0、15、30、60、90、120分間、それぞれ55℃で保温した後、90℃、2分間の処理により酵素を失活させた。各反応液8  $\mu$  lを3% ヌシーブ 3：1 アガロースゲルを使用した電気泳動にて解析した。電気泳動の結果を図2に示す。図中1～6はそれぞれ0、15、30、60、90、120分間反応した反応液の泳動されたレーンを、また、Mは分子量マーカーとして、100bp DNA ladder marker（宝酒造社製）が泳動されたレーンを示す。

【0075】

図2に示されるように、反応時間が0分では増幅産物は確認できなかったが、反応時間が15分、30分、60分と長くなるに従い、増幅産物量が増大していることが確認できた。しかし、60分以上の反応では、電気泳動によって確認される増幅産物量はほぼ横ばいであり、使用された反応系での増幅は60分程度でプラトーに達することが示された。

【0076】

### 実施例2

(1) RNAの調製

本実施例に鋳型として使用するRNAは、ヒト培養細胞HT29 (ATCC HTB-38) (大日本製薬社製) からトライゾール試薬 (ライフテック社製) を用いて調製した。得られたトータルRNAは、その濃度を  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  に調製した。またRNAの純度を分光工学的に調べたところ、 $\text{OD}260/\text{OD}280 = 1.8$  であった。

【0077】

(2) 増幅反応

逆転写活性及びDNAポリメラーゼ活性を有するBcaBEST DNAポリメラーゼとRNaseH エンドヌクレアーゼを用いて、RNAからのcDNAが増幅されるかを検討した。

【0078】

反応液には  $1 \mu\text{g}$  相当の上記トータルRNAを加え、実施例2と同様の組成に調製した。ヒトトランスフェリンレセプター領域を増幅のターゲットとし、プライマーとして実施例1に記載のプライマー対2を用いた。

【0079】

上記の反応液を  $55^{\circ}\text{C}$ 、60分間保温した後、 $90^{\circ}\text{C}$ 、2分間加熱して酵素を失活させた。この反応液のうちの  $8 \mu\text{l}$  を3% ヌシーブ 3:1 アガロースゲルにて電気泳動したところ、予想される56bpの増幅断片が確認できた。さらに、ターゲットとした塩基配列を有するプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションを行なった。その5'末端にビオチン標識を付した、配列表の配列番号4に示される塩基配列のDNAプローブを使用してサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、このプローブは上記の増幅断片にハイブリダイズした。即ち、本発明の方法によりターゲットとした領域が正しく増幅されていることが確認された。

【0080】

【発明の効果】

本発明により、核酸配列の増幅方法及び該方法に使用されるオリゴヌクレオチドプライマーが提供される。本発明の方法は、鋳型となるDNAもしくはRNA

より、等温条件下で連続してDNAを合成することができる。従って、該方法では、特別なサーマルサイクラーを必要とせず、温度設定に要する時間も必要ないため短時間で増幅産物を得られるという優れた効果を奏する。さらに、該方法で短時間に増幅されたDNA断片は、制限酵素消化することができるため、制限酵素長多型や変異検出等の遺伝子検査の領域において有用である。また、該増幅DNA断片は、RNAプローブ調製のための鋳型として使用できる等の遺伝子工学の領域においても有用である。

【0081】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> A method for amplification of nucleotide sequence

<130> T-1371

<160> 4

<210> 1

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Template DNA

<400> 1

ggacagcaac tgggccagca aagttgagaa actcacttta gagaattctg ctttcccttt 60



ccttgcatat tctgagcagt ttctttctgt ttttgcgag

99

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 2

cagcaactgg gccagcaaag tt

22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

Primer

<400> 3

gcaaaaacag aaagaaactg ct

22

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4

tgctttccct ttccttgcat attctg

26

【図面の簡単な説明】

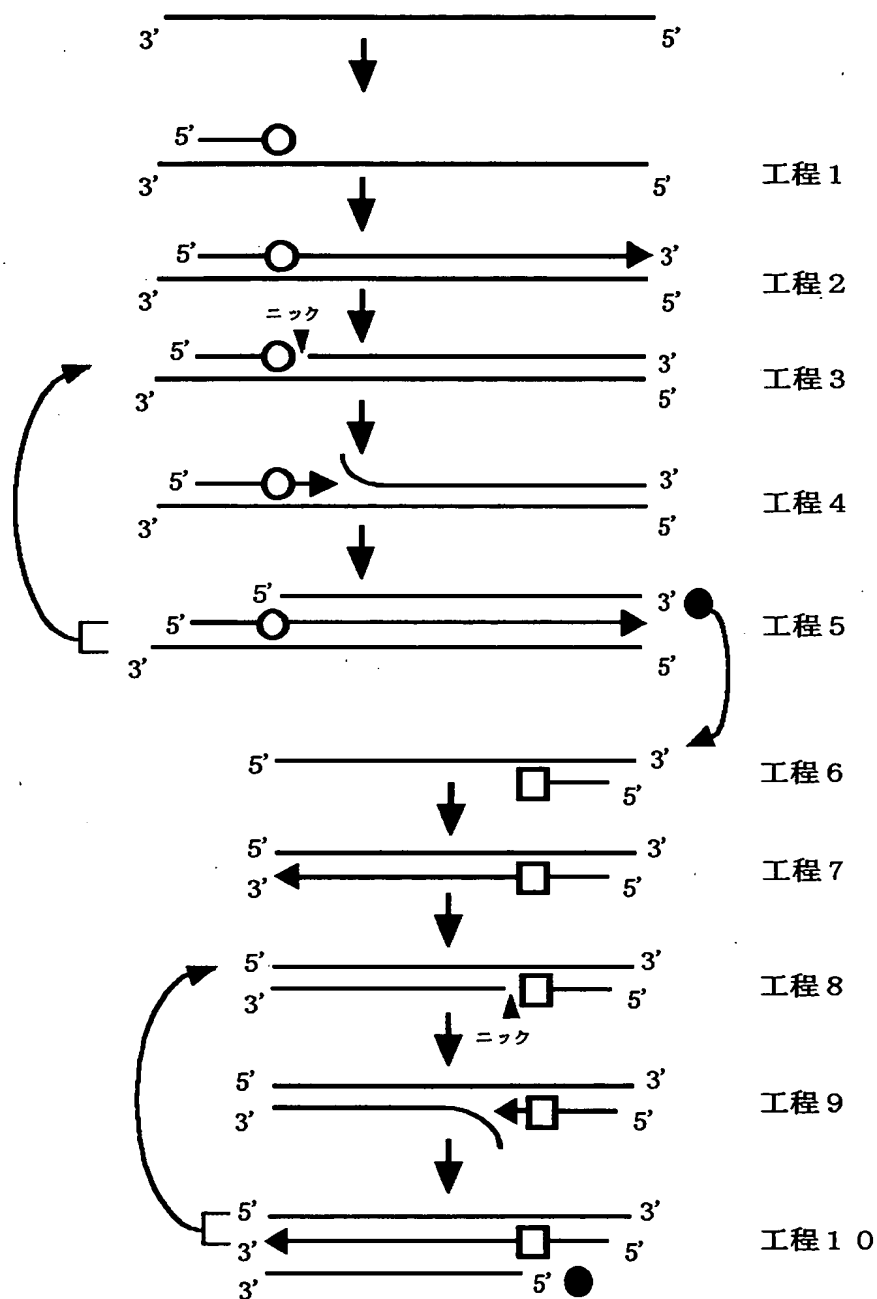
【図 1】 図 1 は、本発明における 1 本鎖 DNA に対する方法の一例を示すフローチャートである。

【図 2】 図 2 は、本発明の方法により種々の反応時間で増幅された増幅 DNA 断片の、アガロースゲル電気泳動の結果を示す図である。

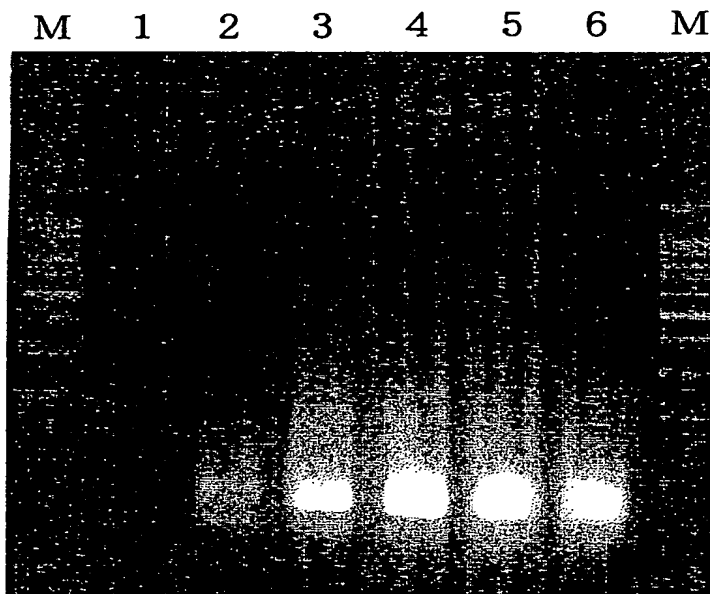
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

遺伝子工学分野において有用であり、操作に要する時間を短縮しうる簡便で効率のよい核酸配列の増幅方法を提供すること。

【解決手段】

核酸配列の増幅のためのプライマーであって、デオキシヌクレオチド及びエンドヌクレアーゼの切断のために配置されたりボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマー、並びに該プライマーを用いた核酸配列の増幅方法。該方法は、鋳型となるDNAもしくはRNA、鎖置換能を有するDNAポリメラーゼ、少なくとも1種類の本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、該プライマー切断のためのエンドヌクレアーゼ及びその他DNA合成のための試薬等により実施される。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591038141]

1. 変更年月日	1991年 2月 4日
[変更理由]	新規登録
住 所	京都府京都市伏見区竹中町609番地
氏 名	寶酒造株式会社